



Srednja šola Slovenska Bistrica  
Ulica dr. Jožeta Pučnika 21  
2310 Slovenska Bistrica

# Preverjanje biološko aktivnih komponent formuliranega ekstrakta cvetnega prahu v organogelu

**Raziskovalna naloga iz zdravstva**

Mentorice:

mag. Damijana Gregorič, prof. kem.  
izr. prof. dr. Maša Knez Marevci, univ. dipl. inž. kem. teh.  
asis. dr. Taja Žitek, mag. inž. kem. teh.

Avtorica: Hana Kocet

# Kazalo

1	Uvod in opredelitev problema .....	1
1.1	Hipoteze.....	1
1.2	Cilji .....	2
2	Teoretični del .....	3
2.1	Cvetni prah.....	3
2.2	Antioksidativna aktivnost.....	5
2.2.1	Trije glavni tipi radikalnih reakcij .....	5
2.2.2	Endogeni in eksogeni dejavniki .....	5
2.2.3	Oksidativni stres.....	5
2.2.4	Uporaba antioksidantov .....	6
2.2.5	Delitev antioksidantov .....	6
3	Metode dela.....	9
3.1	Ekstrakcija trdno-tekoče .....	9
3.1.1	Vpliv dejavnikov na hitrost ekstrakcije.....	9
3.1.2	Vrste ekstrakcij.....	9
3.2	Testi in metode antioksidativnosti.....	11
3.2.1	Določanje antioksidativnosti z radikalno metodo (spektrofotometrična metoda DPPH).....	11
4	Eksperimentalni del .....	13
4.1	Postopek izolacije oziroma ekstrakcije.....	13
4.1.1	Aparature in materiali .....	13
4.1.2	Priprava materiala za postopek ekstrahiranja.....	14
4.1.3	Topla maceracija .....	14
4.1.4	Filtracija in uparjanje.....	15
4.1.5	Izračun izkoristka ekstrakcije in mase ekstrakta .....	17
4.2	Spektrofotometrična metoda .....	18
4.2.1	Aparature in materiali .....	18
4.2.2	Postopek determinacije antioksidativnega potenciala z radikalno metodo DPPH .....	19
4.2.3	Izračun antioksidativne aktivnosti .....	20
4.3	Formulacija ekstrakta v organogel.....	21
5	Rezultati.....	23
5.1	Postopek konvencionalne ekstrakcije .....	23
5.2	Določanje aktioksidativnega delovanja na radikale z metodo DPPH (1,1-difeni-2-pikrilhidrzila) .....	23
5.3	Formulacija ekstrakta v organogel.....	24
6	Zaključek .....	26
6.1	Ključne ugotovitve na podlagi pregledane literature .....	27
6.2	Ovrednotenje rezultatov in metod.....	28
6.3	Možne izboljšave eksperimenta .....	29
7	Literatura .....	30

## **Seznam slik**

Slika 1: Čebela, posuta s cvetnim prahom (Čebelarstvo Jaklič, 2013. <a href="http://cebelarstvo.laprofi.com/cvetni-prah.html">http://cebelarstvo.laprofi.com/cvetni-prah.html</a> .) .....	1
Slika 2: Cvetni prah v granulah (GloryBee, 2022. <a href="https://glorybee.com/wildflower-bee-pollen-granules-16123">https://glorybee.com/wildflower-bee-pollen-granules-16123</a> .) .....	4
Slika 3: Soxhletova aparatura (M. Paić-Karega, Polifenoli u korijenu biljke <i>Urtica dioica L.</i> 2017. file:///C:/Users/38651/Downloads/paickarega_matea_pbf_2017_zavrs_sveuc%20(1).pdf.) .....	10
Slika 4: Potek metode DPPH [41] .....	12
Slika 5: Potek uparjanja vzorca z rotavaporjem .....	14
Slika 6: Potek tople maceracije .....	15
Slika 7: Potek filtracije vzorca .....	16
Slika 8: Tehtanje prazne bučke pred začetkom uparjanja vzorca .....	16
Slika 9: Shranjen ekstrahiran vzorec .....	17
Slika 10: Spektrofotometer .....	18
Slika 11: Priprava vzorca za metodo DPPH .....	19
Slika 12: Pripravljeni vzorci za merjenje z metodo DPPH .....	20
Slika 13: Potek formulacije vzorca .....	21
Slika 14: Kapsuliran in shranjen vzorec .....	22

# Uporabljeni simboli in kratice

## Simboli

$\eta_{ekstrakcije}$	izkoristek ekstrakcije (%)
$m_{ekstrakt}$	masa ekstrakta (g)
$m_{material}$	masa zatehtanega materiala (g)
$m_{bucka}$	masa bučke (g)
$m_{bucka+ekstrakt}$	skupna masa bučke in ekstrakta (g)
$A_c^0$	absorbanca referenčne raztopine v času 0 min
$A_s^{15}$	absorbanca raztopine vzorca v času 15 min

## Kratice

ROS	reaktivne kisikove spojine
RNS	reaktivne dušikove spojine
SOD	superoksid dismutaza
GSH	glutation
GR	glutation reduktaza
GSSG	glutation disulfid
Q10	2,3-dimetoksi-5-metil-6-dekaprenil benzokinon
DNA	deoksiribonukleinska kislina
UV	ultravijolična
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
BHA	salicilna kislina
ALS	amiotrofične lateralne skleroze
MS	multipla skleroza
ABTS	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kisline
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
CUPRA	Cupric reducing antioxidant capacity
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
GC	plinska kromatografija
$C_{18}H_{36}O_2$	stearinska kislina
PLO	Pluronic Lecithin Organogel
PLO	Pluronic Lecithin Organogel
PrLOs	Premium Lecithin Organogels
MBG	Gelatin-Stabilized Microemulsion-Based Organogel

## **Povzetek**

Namen raziskovalne naloge je pridobiti ekstrakt iz cvetnega prahu, mu določiti njegovo antioksidativno aktivnost in ga formulirati v organogel, s tem pa spoznati pozitivne učinke in možne načine njegovega uživanja. Ekstrakt peloda smo pridobili s konvencionalno ekstrakcijo (topla maceracija), za katero smo se odločili na podlagi raziskave literature. Izračunali smo izkoristek ekstrakcije in s spektrofotometrično radikalско metodo DPPH določili antioksidativno aktivnost ekstrakta. V nadaljevanju smo pripravili formulacijo ekstrakta v obliki organogela in ga oblikovali v kapsulo, primerno za uživanje.

**Ključne besede:** cvetni prah, konvencionalna ekstrakcija, antioksidativna aktivnost, organogel

## **Abstract**

The purpose of the research task is to obtain an extract from bee pollen, determine its antioxidant activity and formulate it in an organogel, thereby also learning about its positive effects and possible ways of consuming it. Pollen extract was obtained by conventional extraction (hot maceration), which we decided on based on literature research. We calculated the extraction yield and determined the antioxidant activity of the extract using the spectrophotometric radical DPPH method. We further prepared the formulation of the extract in the form of an organogel and formed it into a capsule suitable for consumption.

**Key words:** bee pollen, conventional extraction, antioxidant activity, organogel

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici mag. Damijani Gregorič za podporo, dobre nasvete in popravke. Zahvaljujem se tudi asis. dr. Taji Žitek za vso pomoč pri eksperimentalnem delu v laboratoriju, pisanju raziskovalne naloge in usmerjanju. Izr. prof. dr. Maši Knez Marevci gre zahvala za strokovno pomoč in da mi je omogočila izvedbo eksperimentov in pisanje naloge na FKKT v Mariboru.



## 1 Uvod in opredelitev problema

Vsi poznamo cvetni prah ali pelod, in sicer kot moške spolne oplojevalne celice rastlin cvetnic, ki ga samice čebel nabirajo poleg nektarja oziroma medičine. Med nabiranjem obojega hkrati skrbijo za oprševanje rastlin, in sicer s prenosom lepljivega peloda na brazdo pestiča s cveta na cvet iste vrste rastline. Z oprševanjem skrbijo tudi za pridelavo semen oziroma plodov, s katerimi poteka razmnoževanje. Pelod je nujno potreben čebelam za prehrano. Ker pridelajo več hrane, kot jo same dejansko potrebujejo, presežek medu, ki ga pridelajo iz medičine in mane, vzamejo čebelarji. [1]

Med se že tisočletja uporablja v prehrani kot sladilo in dodatek k jedem. Poleg medu se v zadnjem času veča zanimanje za uživanje in posledično industrijsko predelavo cvetnega prahu, ki ima, kot smo ugotovili, precej pozitivnih učinkov uživanja. Zaužijemo ga lahko na več načinov oziroma v več oblikah.

Nedavno je bilo ugotovljeno, da čebelji cvetni prah spreminja črevesno mikrobioto za spodbujanje zdravega črevesja. Prav zaradi povečanega zanimanja zanj smo se tudi mi odločili, da ga predelamo in pripravimo v obliko, pripravljeno za zaužitje. [2]



Slika 1: Čeba, posuta s cvetnim prahom (Čebelarstvo Jaklič, 2013)

### 1.1 Hipoteze

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si zastavili naslednje hipoteze.

Prva hipoteza: Predvidevamo, da bo izkoristek izbrane metode ekstrakcije znašal pod 50 odstotki.

Druga hipoteza: Predpostavljamo, da bo vrednost antioksidantov ekstrakta glede na literaturo znašala več kot 8 odstotkov.

Tretja hipoteza: Pri formulaciji ekstrahiranega vzorca v organogel bomo poleg stearinske kisline morali uporabiti tudi olje.

## 1.2 Cilji

- Pravilna izvedba uporabljenih metod in tehnik.
- Spoznanje novosti o cvetnem prahu in raznih postopkih predelave.
- Predstavitev ugotovljenih podatkov o optimalni predelavi ozziroma ekstrakciji cvetnega prahu iz literature.
- Ugotovitev različnih možnosti uživanja formuliranih naravnih ekstraktov in njihove potencialne uporabe v prehrambeni, farmacevtski in živilski industriji.

## 2 Teoretični del

### 2.1 Cvetni prah

Zrnca cvetnega prahu ali peloda se tvorijo v pelodnih vrečkah prašnikov semenk. Med seboj se razlikujejo po velikosti, obliki, barvi in površinskih strukturah. Namenjena so spolnemu razmnoževanju rastlin in so nosilec moških spolnih celic.

Za pelodna zrna vetrocvetk je značilno, da imajo ogromne količine peloda, ki je suh in lahek, saj ga odnaša veter, tako da le malo peloda doseže brazdo pestiča. Žužkocvetke imajo manj pelodnih zrn, ki so večja in lepljiva; prenašajo jih žuželke, za kar imajo zelo veliko in barvito cvetno odevalo. [3, 4]

Pelod je proteinsko najbogatejši del rastline. Čebele obiskujejo cvetje, da naberejo nektar, do katerega pa ne morejo, ne da bi s seboj odnesle tudi lepljivi pelod na prašnikih, ki se ujame na drobne dlačice, s katerimi je prekrito čebelje telo. Čebela si pelod z nogami in s ščeticami nato očisti s telesa, ga navlaži s slino in z medicino ter shrani v košek, ki je posebno mesto za zbiranje peloda. Čebele v panju ga navlažijo s slino, stlačijo na dno celice in prekrijejo s tanko plastjo medu, s čimer preprečijo kvarjenje. Čebele nujno potrebujejo pelod za hranjenje svojih ličink in izločanje voska. [4, 5]

Vsaka vrsta cvetnih rastlin ima svoja značilna pelodna zrna, vsa pa vsebujejo:

- vse življenjsko pomembne esencialne aminokisline (tryptofan, fanilalanin, valin, histidin, izolevcin, levcin, lizin, metionin ...),
- antioksidante,
- kisline (biotin, rutin, inozitolno, folno ...),
- makroelemente (natrij, magnezij, kalcij, fosfor, kalij) in mikroelemente (cink, baker, mangan, železo, selen),
- razne maščobne kisline (arhaično, linolno in  $\gamma$ -linolno kislino, fosfolipide in fitosterole),
- ogljikove hidrate,
- polifenole (vključno z levkotrieni, katehini, fenolnimi kislinami in flavonoidi),
- vitamine skupine B, C, D, E, K, B1, B2 ... , provitamin A in minerale ter
- inhibine, ki zavirajo razvoj nekaterih vrst bakterij. [4, 5, 6, 7]

Cvetni prah pridobivamo s smukanjem ali z izkopanjem iz satnih celic ali v satju.

Cvetni prah osmukanec se odvzame čebelam s smukalniki, ki imajo posebno mrežico, ki čebelam z nožic osmuka kepice cvetnega prahu. Ta pada skozi mrežo v predalček za zbiranje. Smukalniki so lahko nameščeni na zunanjji strani panja na žrelu ali v notranjosti.

Cvetni prah izkopianec vzamemo s posebno žličko iz satja, v katero ga čebele shranijo in obogatijo z izločki svojih žlez. V satju je cvetni prah že fermentiran in vsebuje manj vode; pri njegovem shranjevanju pride v odsotnosti kisika do mlečnokislinskega vrenja. Takšen cvetni

prah je precej kvalitetnejši od osmukanca, vendar lahko pride pri procesu pridobivanja do poškodbe satja. [4, 5, 7]

Uživanje cvetnega prahu ima za človeka veliko pozitivnih učinkov, saj:

- pospešuje venozno in arterijsko cirkulacijo krvi (pomaga zmanjšati visoke vrednosti maščob v krvi, kot je holesterol, kar izboljša cirkulacijo in pretok krvi v možganih);
- izboljšuje diurezo, delovanje ledvic, presnovo kosti, celjenje ran;
- deluje splošno krepčilno, posebej na srčno mišico;
- deluje na povečanje odpornosti kapilar, preprečuje krvavitve, skrajša čas strjevanja krvi in uravnava ritem srca;
- ga (izkopanec) kot zdravilo in krepčilo uporabljamo pri slabokrvnosti (anemiji), pomanjkanju ali izgubi moči in energije (asteniji), trebušno-črevesnih boleznih (gastritis, čiri, enterokolitis, kolitis, zapeka), pri aterosklerozi, zmanjšani spolni moči, povišanem krvnem tlaku (arterijski hipertenziji), vnetju prostate (prostatitisu), hipertrofiji prostate, hepatitisu, cirozi, nevrozi in pri okrevanju po težkih boleznih ali operacijah. [8]

Zaužijemo ga lahko v več oblikah, in sicer kot kapsule, tablete (tudi žvečljive), pasto iz matičnega mlečka ali zrnca, ki jih lahko potresememo v jogurt, smuti, na solato idr. Primeren je za otroke in odrasle. Priporočen odmerek je 3–5 čajnih žličk za odrasle in 1–2 žlički za otroke.

Stranski učinki uživanja cvetnega prahu so pri posameznikhi lahko alergijske reakcije, zato je priporočljivo, da smo pozorni na opozorilne znake na izdelkih s cvetnim prahom oziroma da ga ob že potrjeni alergiji nanj ne užijemo. [6, 9]



Slika 2: Cvetni prah v granulah (GloryBee, 2022)

## 2.2 Antioksidativna aktivnost

Antioksidanti so naravne ali sintetične snovi, ki lahko preprečijo ali upočasnijo oksidativne poškodbe na naše celice. Človeško telo naravno tvori proste radikale (stranske proizvode), ki so zelo nestabilne molekule (so reaktivni zaradi neveznega oziroma prostega elektrona), neprestano (lahko nastanejo pri celični presnovi). Pri tem oksidirajo organske sestavine celic. V zmernih oziroma nizkih koncentracijah imajo ROS in RNS ugodne učinke, ob visokih koncentracijah pa lahko prosti radikali povzročijo oksidativni stres, to je vsako stanje v celici, ko je porušeno ravnotežje med reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) in antioksidanti v prid ROS. Ker oksidativni procesi prevladujejo nad antioksidativnimi, je porušeno ravnovesje med nastajanjem reaktivnih zvrsti in sposobnostjo njihovega odstranjevanja, posledica česar je obolenje (nastanek škodljivih znotrajceličnih procesov in razvoja različnih patoloških stanj oziroma bolezni). Za nadzor ravnovesja skrbijo pri zdravem človeku antioksidanti oziroma endogeni obrambni sistemi. [4, 10, 11, 12]

### 2.2.1 Trije glavni tipi radikalnih reakcij

Prosti radikali reagirajo zelo hitro in z vsako spojino na poti, reakcija pa poteka po enem izmed treh načinov.

- Odvzem vodikovega atoma: nastane nov radikal, ki vstopi v nadaljnje reakcije.
- Adicija radikala na dvojno vez: nastane nov radikal, ki nato sodeluje v nadalnjih reakcijah.
- Reakcija dveh radikalov: prosta elektrona se združita v novo kovalentno vez, nastane neradikalni produkt, ki lahko nato ponovno reagira z drugimi radikali. [4, 13]

Telo uporablja reaktivne spojine oziroma zvrsti za obrambo pred patogeni.

### 2.2.2 Endogeni in eksogeni dejavniki

Endogeni dejavniki, ki v telesu povzročajo nastajanje reaktivnih snovi, so psihični stres, kronično vnetje, prekomerna telesna aktivnost in metabolizem nekaterih ksenobiotikov (npr. paracetamola), hrane (npr. nasičenih maščobnih kislin) in alkohola.

Med eksogene dejavnike se uvrščajo elektromagnetna sevanja (UV-svetloba, ionizirajoče sevanje), izpostavljenost visokim temperaturam, pesticidom, težkim kovinam (Fe, Cu, Co, Cr), ultrazvok in vdihavanje cigaretnegra dima in ozona. [13, 14]

### 2.2.3 Oksidativni stres

Oksidativni stres sodeluje pri nastanku številnih bolezni, kot so kardiovaskularne bolezni, rak, nevrodegenerativne bolezni (npr. Parkinsonova bolezen, Huntingtonova bolezen, ALS in MS), slatkorna bolezen, kronično vnetje, revmatoidni artritis, astma, vpeleten je tudi pri staranju. [12, 15]

## 2.2.4 Uporaba antioksidantov

Antioksidante uporabljamo tudi v živilskih izdelkih za doseganje daljšega roka uporabe, v kozmetiki za zaščito sestavin izdelka, podaljšanje roka uporabe in kot aktivne sestavine z nalogo ščitenja kože pred antioksidativnimi poškodbami in staranjem.

Uporabljamo jih tudi v medicini, in sicer kot sredstva za zmanjševanje verjetnosti nastanka raka, za zdravljenje bolezni jeter, kot terapevtska sredstva za akutne poškodbe centralnega živčnega sistema in za upočasnitev bolezni, povezanih z oksidativnimi poškodbami celic (Alzheimerjeva bolezen, ateroskleroza ...). [12, 13]

## 2.2.5 Delitev antioksidantov

Antioksidane lahko delimo na več različnih načinov (antioksidante endogena in eksogena, hidrofilne in hidrofobne antioksidante, encimske in neencimske oksidante, regeneracijske in neobnovljive antioksidante). Poglejmo si nekatere naštete delitve nekoliko podrobneje.

### – Delitev glede na mehanizem delovanja

Glede na mehanizem delovanja lahko antioksidante razdelimo v tri skupine.

- Encimski oksidanti: katalizirajo pretvorbo reaktivnih snovi v nereaktivne ali manj reaktivne. Med najpomembnejšimi so super dismutaza, glutation peroksidaza in katalaza, ki sodelujejo pri odstranjevanju superoksidnega radikala.
- Reducenti ali tako imenovani lovilci radikalov: neposredno reagirajo z radikali, prekinejo verižno radikalско reakcijo in preprečijo nastanek oksidativnih poškodb molekul. Predstavniki so vitamina E in C, polifenoli, karotenoidi idr.
- Kelatorji kovinskih ionov: vežejo ione prehodnih kovin (Fe, Cu) in zmanjšajo njihovo razpoložljivost. Predstavniki so nekateri proteini (transferin, laktoferin, feritin ...).

### – Delitev glede na antioksidativne mehanizme

- Primarni delujejo preventivno in preprečujejo nastanek radikalov in reaktivnih snovi. Sem uvrščamo encimske antioksidante in kelatorje kovinskih ionov.
- Sekundarni antioksidanti so reducenti in nevtralizirajo že nastale radikale, prekinjajo verigo in pretvorijo proste radikale v stabilnejše, neradikalne produkte.
- Tercialni antioksidanti so tisti, ki sodelujejo pri odpravljanju oksidativnih poškodb proteinov, DNA in lipidov ter s tem obnovijo antioksidativno delovanje. [7, 16]

### – Endogeni izvor antioksidantov

Endogene antioksidante proizvaja telo samo, saj se sintetizirajo znotraj naših celic in so temeljni obrambni mehanizem proti odvečni koncentraciji ROS. Med najpomembnejše štejemo encimske antioksidante, ki neposredno prispevajo k obrambi pred reaktivnimi kisikovimi spojinami in so prvi obrambni mehanizem telesa. [17]

To so ...

- Katalaza (pretvarja vodikov peroksid v vodo in molekularni kisik).
- Glutation (encim GR katalizira redukcijo GSSG v glutation (GSH), ki je bistvena molekula pri upiranju oksidativnemu stresu in gradnik imunskega sistema; naše telo ga izdeluje samo, prisoten je v vseh celicah, še posebej veliko pa ga najdemo v rdečih krvničkah, celicah oči in celicah imunskega sistema). [18]
- Superoksid dismutaza (SOD) (znotrajcelični antioksidant, ki pospeši razpad superokksida v neradikalski vodikov peroksid in kisik).
- Tioredoksin reduktaza (encim, ki izvaja reakcijo redukcije tioredokssina na tioredoksin disulfid). [19]
- Koencim Q10 (prisoten v vseh celičnih membranah, jih stabilizira in ima ključno vlogo pri tvorbi energije in preprečevanju tvorbe lipidnih peroksilnih radikalov ter ima sposobnost regeneracije vitamina E; organizem sam sintetizira potreben koencim Q10, vendar učinkovitost tvorjenja peša s starostjo, zato primanjkljaj nadomeščamo z drugimi viri, kot so hrana in prehranska dopolnila). [20]
- Alfa lipoična kislina (močan antioksidant, ki vsebuje žveplo in kelira kovinske ione oziroma sodeluje pri procesih razstrupljanja težkih kovin v jetrih in zmanjšuje celične učinke staranja; telo jo sintetizira samo, kot prehransko dopolnilo se uporablja za zaščito celic pred škodljivimi učinki oksidativnega stresa).

### – Eksogeni izvor antioksidantov

Kljub zelo učinkovitim endotermnim mehanizmom le-ti niso dovolj za celotno obrambo telesa pred škodljivimi radikali, zato smo odvisni tudi od eksogenih antioksidantov. V telo jih vnašamo s hrano. Najpomembnejše navajamo. [7, 21]

#### – Vitamin C

Aksorbinska kislina je najpomembnejši vodotopni antioksidant. Sodeluje pri tvorbi kolagena (je potreben za delovanje žil, kosti, hrustanca, dlesni, kože in zob) in delovanju imunskega sistema. Živila z največ vitamina C so rastlinskega izvora, npr. paprika, jagodičevje in citrusi. [22]

#### – Vitamin E

Vitamin E je antioksidant v lipofilnih okoljih celice in najpomembnejši zaviralec lipidne peroksidacije. Najpogosteje se nahaja v obliki gamatokoferol, njegova najaktivnejša oblika je alfa-tokofenol. Pridobimo ga predvsem z živili, ki so bogata z rastlinskimi olji, npr. olje koruznih in pšeničnih kalčkov, olje oljčne gorčice, oreščki ... [23]

#### – Karotenoidi

Karotenoide vsebujejo vse zelene rastline kot pomožna fotosintetska barvila (npr.  $\beta$ -karoten, lutein, violaksantin, neoksantin,  $\alpha$ - in  $\beta$ -criptoksansntina, zeaksantina, anteraksantina ...). Z absorbcoijo presežne energije, ki jo klorofili absorbirajo za potrebe fotosinteze, karotenoidi preprečijo nastanek škodljive oblike kisika.

Prepoznamo jih po njihovih značilnih živobarvnih (oranžnih, rdečih in rumenih) pigmentih. Najdemo jih v zrelem sadju, korenju, paradižniku in rumenem jesenskem listju. [24]

#### – Fenolne spojine

Fenoli so skupina rastlinskih sekundarnih metabolov, za katere je značilna prisotnost fenolne skupine. Gradi jih aromatski obroč z eno hidroksilno skupino ali več. Glede na število aromatskih hidroksilnih skupin v molekuli fenolne spojine delimo na monofenole, difenole in polifenole. Naravni fenoli so lahko preprosti, totalni fenoli (npr. fenolne kisline, flavonoidi, flavoni itd.) ali so lahko visoko polimerizirane spojine (npr. tanini).

Pomembni so, saj prispevajo k okusu (npr. čaj), vonju in barvi pihače (npr. rdeče vino) in živil. [25, 26]

Eksogene antioksidante pridobimo torej z zaužitjem hrane (npr. s sadjem, z zelenjavo, s stročnicami in polnozrnatimi izdelki) ali omega-3 maščobne kisline ali prehranskih dopolnil, kot so vitamini, minerali, vlakna, maščobe in aminokisline.

### 3 Metode dela

#### 3.1 Ekstrakcija trdno-tekoče

Ekstrakcija je postopek, s katerim iz trdnih ali tekočih zmesi odstranjujemo topne komponente s topilom. Temelji na različni topnosti sestavin zmesi v topilu. Če se spojina iz trdne zmesi v danem topilu razaplja, potem se v topilo ekstrahira. Pogoje je, da je mnogo bolje topna v topilu kot ostale sestavine zmesi. Pridobljeno snov imenujemo ekstrakt. Postopek sestoji iz dveh zaporednih operacij: najprej spravimo zmes v intenziven stik s topilom, nato obe fazi ločimo.

##### 3.1.1 Vpliv dejavnikov na hitrost ekstrakcije

Na hitrost ekstrakcije vpliva več dejavnikov.

- Velikost in struktura delcev (manjša kot je velikost, večja je medfazna površina, ekstrakcija poteče hitreje; v primeru zelo finih delcev lahko pride do oviranja separacije delcev in fluida, fini material se sprime v večje delce in tako je pretok topila oviran),
- topilo (biti mora selektivno in z nizko viskoznostjo),
- temperatura (običajno s povišanjem temperature narašča topnost komponente in posledično hitrost ekstrakcije; pri visokih temperaturah lahko pride do uničenja biološke aktivnosti (antioksidanti in proantocianidini), zato moramo obratovalno temperaturo izbrati premišljeno),
- mešanje fluida (z mešanjem dosežemo večji snovni prenos s površine materiala v glavno maso topila, prav tako preprečujemo sedimentacijo delcev). [27, 28]

Postopek uporabljam za pridobivanje olj iz plodov in semen ter za pridobivanje začimb in farmacevtskih substanc iz rastlin in sadežev. Tako lahko ločimo organske spojine od anorganskih, pridobivamo barvila iz naravnih virov ali si z ekstrakcijo vodotopnih spojin pripravimo napitek (čaj, kavo).

##### 3.1.2 Vrste ekstrakcij

Med najpogosteje uporabljenimi ekstrakcijami so ekstrakcija po Soxhletu, hladna maceracija, topla maceracija, ultrazvočna in superkritična ekstrakcija. [29]

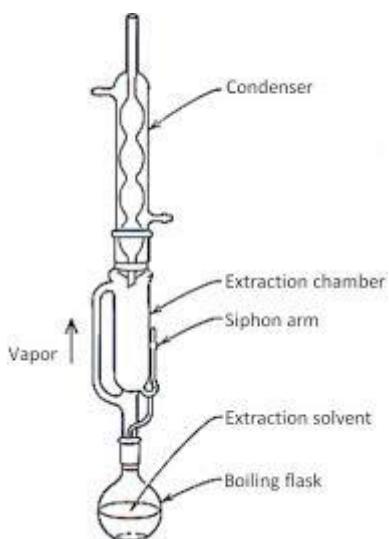
###### 3.1.2.1 Konvencionalne ekstrakcijske metode

Med konvencionalne vrste ekstrakcij spadata Soxhletova ekstrakcija in maceracija, ki ju bomo opisali v nadaljevanju. [30]

### – Ekstrakcija po Soxhletu

Ekstrakcija po Soxhletu je postopek prenosa delno topnih komponent iz trdne v tekočo fazo z do refluksa segretim topilom. Je ena najbolj razširjenih ekstrakcijskih metod s segrevanjem v laboratorijih. Deluje po principu povratnega hlajenja topila. Je enostavna in zelo učinkovita metoda, saj ekstraktov ni treba filtrirati, deluje pri višji temperaturi, ki vpliva na večjo topnost komponent.

Poteka tako, da topilo nalijemo v bučko in segrevamo, da zavre. Pare se zaradi povratnega hladilnika utekočinijo, zato kondenzat kaplja na trdno zmes v filtrnem tulcu in tako pride topilo v stik s trdno snovjo. Ko topilo doseže višino odtoka (v ekstrakcijski komori in sifonski cevi), ga potegne nazaj v bučko in postopek se ponovi. [31, 32]



Slika 3: Soxhletova aparatura (M. Paić-Karega, 2017)

### – Ekstrakcija z maceriranjem

Ekstrakcija z maceriranjem je ena najpreprostejših ekstrakcijskih tehnik, pri kateri se grobi in praškasti rastlinski material namoči v topilih, kot so metanol, etanol, etil acetat, heksan itd. Pogosto se uporablja za ekstrakcijo različnih bioaktivnih spojin iz rastlinskega materiala. Učinkovitost ekstrakcije je predvsem odvisna od vrste topila, njegove polarnosti ter kombinacije časa in temperature. Omejitve pri tem postopku so lahko nizek izkoristek ekstrakcije in uporaba velike količine topila. Zaradi enostavnosti in učinkovitosti tega postopka so ga dolgo uporabljali za pridobivanje eteričnih olj in drugih bioaktivnih spojin.

Poteka tako, da zmeljemo rastlinski material na manjše delce, da se poveča površina za mešanje z izbranim topilom in učinkovito ekstrakcijo spojin. Pripravljeno spojino zapremo, da preprečimo izhlapevanje topila, mešamo v različnih intervalih in filtriramo skozi filtrirni medij. [33, 34, 35]

V nadaljevanju bomo opisali še ultrazvočno in superkritično ekstrakcijsko tehniko.

#### – Ekstrakcija z ultrazvokom

Ultrazvočna ekstrakcija je prednostna tehnika za pridobivanje bioaktivnih spojin iz rastlin, saj dosega visokokakovostno ekstrakcijo v zelo kratkem času in z majhnimi stroški. Uporablja se v živilih, prehranskih dopolnilih in v farmacevtski industriji, pomembna pa je tudi pri doseganju cilja zelene ekstrakcije in kemije.

Ultrazvočna tehnologija ekstrakcije uporablja kavitacijo (nastajanje in propadanje majhnih mehurčkov v tekočini), ki jo proizvajajo ultrazvočni valovi in je posledica spremembe visokih in nizkih tlačnih valov, ki jih povzročajo ultrazvočni pretvorniki. Interakcija ultrazvočnih valov z raztopino vzorca povroča intenzivno mešanje in posledično interakcijo med topilom in analiti; ta ekstremni stres premaga selektivnost membrane, perforira in moti celično steno ter tako doseže visokokakovostni transport med notranjimi celicami in okoliškim topilom. [27, 36, 37, 38]

#### – Superkritična ekstrakcija

Superkritična ekstrakcija je postopek pridobivanja ekstraktov in učinkovin s topilom ogljikovega dioksida, ki se nahaja v super kritičnih pogojih. Takšna topila imajo vse fizikalne lastnosti plinov, vendar so nestisljivi in imajo enako moč raztapljanja kot fluidi, zaradi česar delujejo kot topilo. Superkritična ekstrakcija se izvaja z visokotlačno ekstrakcijsko napravo in se uporablja za pridobivanje bioučinkovin iz zelišč in rastlin, pri katerih se zahteva visoka stopnja čistosti ekstraktov, to je predvsem v farmaciji in prehrambni industriji. Metoda velja za okolju prijazno, saj z njo v ozračje ne spuščamo onesnaženosti. [39, 40]

Iz rezervoarja dovajamo plin (ga stisnemo, zaradi česar se posledično segreje v visokotlačni črpalki do želene temperature) v ekstraktor, v katerem se raztaplja do želene komponente v tekočini. Nato izvedemo seperacijo CO<sub>2</sub> (z znižanjem tlaka) in tako dobimo čisti ekstrakt.

## 3.2 Testi in metode antioksidativnosti

Antioksidativno kapaciteto lahko določamo s številnimi analitskimi tehnikami, in sicer po:

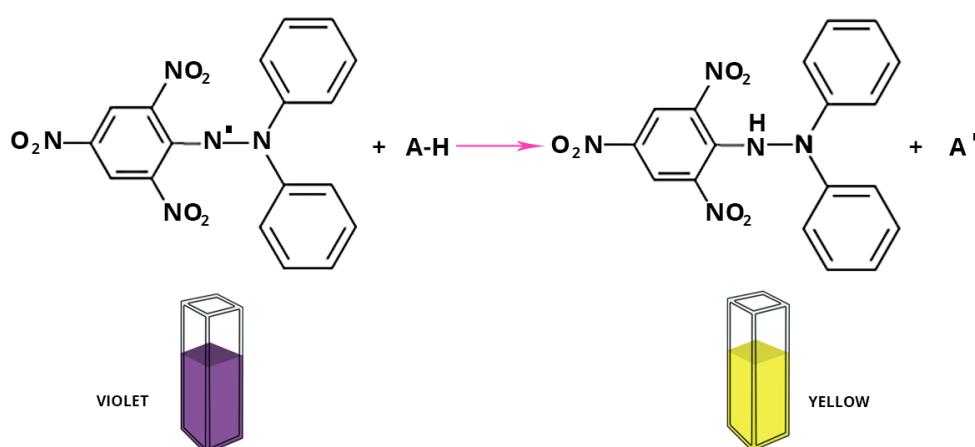
- spektrofotometrični (testi DPPH, ABTS, FRAP, CUPRA, ORAC ...),
- elektrokemijski (ciklična voltametrija, amperometrija, bioamperometrija) in
- kromatografski metodi (HPLC, GC).

Izbor metode je odvisen od vzorca, težavnosti, trajanja testa in eksperimentalnih parametrov.

### 3.2.1 Določanje antioksidativnosti z radikalsko metodo (spektrofotometrična metoda DPPH)

Antioksidativno aktivnost ekstraktov določamo z uporabo stabilnega prostega radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Ta metoda je ena izmed najstarejših in najbolj uporabljenih metod; uporablja se lahko tako za trdne kot za tekoče vzorce. Metanolna raztopina radikala

DPPH je vijoličasto obarvana in ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 515 nm. Pri reakciji DPPH z antioksidantom nastane DPPH<sub>2</sub>, ki ne absorbira pri navedeni valovni dolžini (515 nm), kar se vidi tudi v spremembi barve. Spremembe v barvi raztopine radikala DPPH (od močno vijolične do svetlo rumene) merimo s spektrofotometrom pri valovni dolžini 515 nm. Za določanje antioksidativne aktivnosti uporabljamo metanolno raztopino radikala DPPH z absorbenco približno 1,0. Metoda torej temelji na merjenju spremembe absorbance, ki nastane pri redukciji radikala z antioksidantom. Metoda velja za preprosto, hitro in učinkovito.



Slika 4: Potek metode DPPH [41]

Na sliki 4 je prikazana sprememba barve, ki nastane s prenosom vodika. DPPH, ki je sprva vijoličen, postane svetlo rumen DPPH-H. [41]

## 4 Eksperimentalni del

V sklopu raziskovalne naloge smo naravni material (cvetni prah) zmleli, ga ekstrahirali, mu določili vsebnosti biološko aktivnih komponent (antioksidativno delovanje), formulirali ekstrakt v organogel in ga kapsulirali. V nadaljevanju so našteti postopki tudi opisani.

### 4.1 Postopek izolacije oziroma ekstrakcije

#### 4.1.1 Aparature in materiali

##### Material:

- rastlinski material (cvetni prah)

##### Reagent:

- 70-odstotna vodna raztopina etanola (v/v) (30 mL destilirane vode smo dodali 70 mL absolutnega etanola)

##### Pribor:

- bučka z ravnim dnom
- magnetni mešalček
- merilni valj (100 mL)
- kristalizirka
- povratni hladilnik
- nuča z nastavkom
- filter papir
- bučka z okroglim dnom
- eksikator
- žlička in spatula

##### Aparature:

- klasična in analitska tehnika
- magnetno mešalo z grelcem
- rotavapor (rotacijski uparjalnik)



Slika 5: Potek uparjanja vzorca z rotavaporjem

#### 4.1.2 Priprava materiala za postopek ekstrahiranja

Cvetni prah, pridobljen iz tipičnih slovenskih travniških rastlin, smo pridobili pri Čebelarni Novak, d. o. o. (Slovenija, Zgornja Slivnica). Granule, ki so bile premera 3 mm, smo zmleli v prah.

#### 4.1.3 Topla maceracija

Kot optimalni postopek za ekstrahiranje smo izbrali toplo maceracijo. Iz naravnega materiala smo pridobili ekstrakt s kontinuiranim mešanjem (1500 rpm) pri temperaturi 40 °C. Čas ekstrahiranja je bil 2 uri, topilo je bil 70-odstotni etanol.

Material smo pred ekstrakcijo zmleli. 25 g posušenega zmletega cvetnega prahu smo zatehtali v čašo, dodali 150 mL topila (70-odstotna vodna raztopina etanola), magnetni mešalček in čašo pokrili s parafilmom ter tako preprečili izhlapevanje topila. Ekstracijska zmes se je tako enakomerno mešala 30 minut pri konstantni temperaturi 40 °C (proces tople maceracije). Po preteku časa smo mešanje ustavili, odstranili parafilm in magnetni mešalček ter ekstracijsko zmes prefiltrirali. Raztopino ekstrakta smo uparili, ostanek materiala na filter papirju pa zavrgli. Raztopino ekstrakta smo prelimi v stehtano bučko z okroglim dnom. Bučko smo namestili na rotavapor (rotacijski uparjalnik) in odparili topilo do suhega preostanka ekstrakta. Bučko z ekstraktom smo shranili v eksikator, da se osuši še preostala vлага. Bučko s suhim ekstraktom smo stehtali in določili maso ekstrakta ter izračunali izkoristek ekstrakcije. Tako pripravljen suhi ekstrakt smo uporabili za nadaljnje analize.



Slika 6: Potek tople maceracije

Zmlet cvetni prah smo dali v čašo in vanjo dolili izbrano topilo v razmerju 70 : 30 (70 odstotkov etanola, 30 odstotkov destilirane vode). Nato smo dodali magnetni mešalček in čašo pokrili s parafilmom (preprečimo izparevanje). Zmes smo mešali pol ure pri 40 °C.

#### 4.1.4 Filtracija in uparjanje

Uporabljena seperacijska procesa smo uporabili zaporedoma. Sprva smo izvedli filtracijo, pri čemer je lij s specializiranim filtrnim papirjem zadrževal suspenzijo (oborino) in prepuščal filtrat (tekočino). Nato smo z rotavaporjem uparili topilo s podtlakom pri 40 °C.



Slika 7: Potek filtracije vzorca

Po preteklih 30 minutah smo zmes prefiltrirali in preostalo oborino na filtrnem papirju zavrgli. Prefiltrirano tekočino smo nato uparili z rotavaporjem.



Slika 8: Tehtanje prazne bučke pred začetkom uparjanja vzorca

Preden smo preostalo tekočino iz filtriranja prelili v bučko in začeli s postopkom uparevanja, smo morali prazno bučko stehtati, da bi po uparevanju lahko izmerili dobljeno maso ekstrakta ter posledično izračunali izkoristek ekstrakcije.



Slika 9: Shranjen ekstrahiran vzorec

Po končani ekstrakciji smo ekstrakt shranili v stekleničko, ki smo jo postavili v hladilnik.

#### 4.1.5 Izračun izkoristka ekstrakcije in mase ekstrakta

Izkoristek ekstrakcije ( $\eta_{ekstrakcije}$ , v %) smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\eta_{ekstrakcije} = \frac{m_{ekstrakt}}{m_{material}} \cdot 100$$

pri čemer sta

$m_{ekstrakt}$  – masa ekstrakta (v g)

$m_{material}$  – masa zatehtanega materiala (v g)

Maso ekstrakta  $m_{ekstrakt}$  določimo na osnovi razlike mas bučke z ekstraktom ( $m_{bucka+ekstrakt}$ ) in prazne bučke z okroglim dnom ( $m_{bucka}$ ) po naslednji enačbi:

$$m_{ekstrakt} = m_{bucka+ekstrakt} - m_{bucka} \quad [42]$$

## 4.2 Spektrofotometrična metoda

### 4.2.1 Aparature in materiali

#### Kemikalije:

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)
- metanol

#### Reagenti:

- raztopina DPPH v metanolu ( $1 \times 10^{-5}$  M) (za pripravo 100 mL raztopine smo zatehtali 2,36 mg DPPH in razredčili do oznake (100-mL merilna bučka) ter dobro premešali, da se je ves DPPH raztopil)

#### Pribor:

- merilne bučke (100 in 10 mL)
- avtomatski pipeti
- temne stekleničke (10 mL)
- spatula

#### Aparaturi:

- analitska tehnica
- spektrofotometer



Slika 10: Spektrofotometer

#### 4.2.2 Postopek determinacije antioksidativnega potenciala z radikalско metodo DPPH

Po ekstrakciji smo preverili še antioksidativno aktivnost našega ekstrakta po metodi DPPH. V 10-mL merilno bučko smo zatehtali 10 mg vzorca in razredčili do oznake z metanolom. Vzorec smo dobro premešali, da se je ekstrakt raztopil.

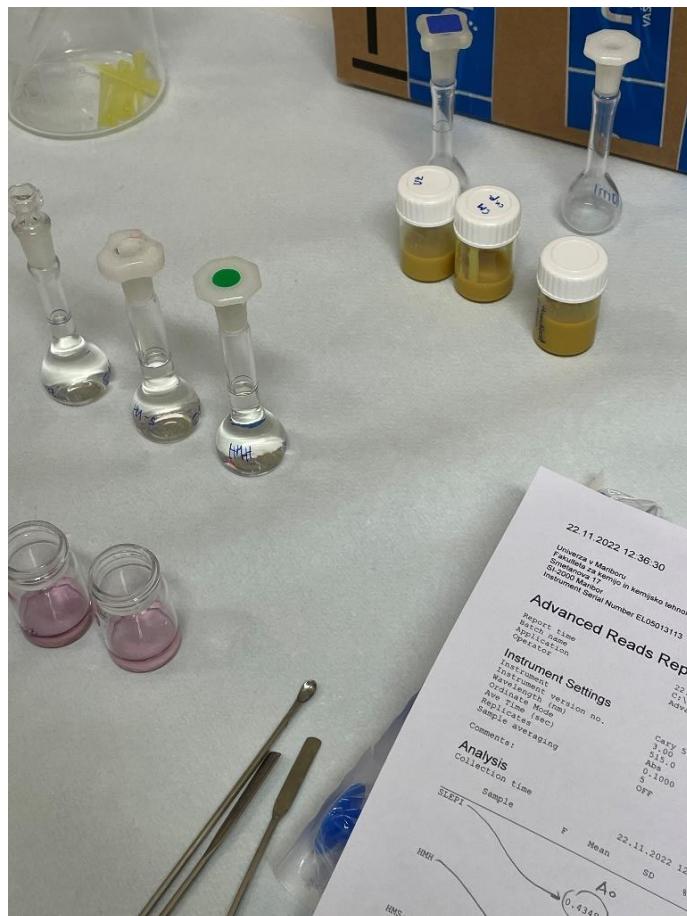
Pripravili smo tudi  $1 \times 10^{-5}$  M raztopino DPPH v metanolu. V temno stekleničko smo odpipetirali 3 mL raztopine DPPH in 77  $\mu$ L raztopine ekstrakta, zmešali in tako pripravljen vzorec termostatirali 15 minut pri sobni temperaturi v temnem prostoru. Nato smo izmerili absorbanco raztopine pri 515 nm. Referenčno raztopino smo pripravili enako kot vzorec, le da smo namesto raztopine vzorca odpipetirali 77  $\mu$ L metanola in absorbanco raztopine izmerili takoj.



Slika 11: Priprava vzorca za metodo DPPH

Na sliki 11 je prikazano tehtanje 10 mg ekstrakta v merilno bučko, v katero smo nato dolicili metanol do oznake 10 mL in vzorec dobro premešali.

V novo stekleničko smo nato zatehtali 3 mL raztopine DPPH, odpipetirali 77  $\mu\text{L}$  raztopine ekstrakta, zmešali in vzorec termostatirali 15 minut v temnem prostoru.



Slika 12: Pripravljeni vzorci za merjenje z metodo DPPH

Na sliki 12 vidimo pripravljeni vzorce po izmerjeni DPPH antioksidativni aktivnosti našega ekstrakta.

#### 4.2.3 Izračun antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost vzorca je podana kot odstotek inhibicije glede na referenčno raztopino in se izračuna po enačbi:

$$\% \text{ inhibicije} = \left( \frac{A_c^0 - A_s^{15}}{A_c^0} \right) \cdot 100$$

pri čemer sta

$A_c^0$  absorbanca referenčne raztopine v času 0 minut

$A_s^{15}$  absorbanca raztopine vzorca v času 15 minut [42]

### 4.3 Formulacija ekstrakta v organogel

Vzorec smo želeli kapsulirati, zato smo ga najprej formulirali v organogel. Ekstraktu smo dodali stearinsko kislino z molekulske formulo  $C_{18}H_{36}O_2$  (služi kot gelator) in magnetni mešalček ter zmes segrevali na magnetnem mešalu z grelcem, dokler nista ekstrakt in stearinska kislina postala homogena. Gelator je povzročil, da se je ekstrakt ob ohladitvi strdil in se je oblika kapsuliranega vzorca obdržala. Vzorec smo nato shranili v malo kapsulo, pripravljeno za zaužitje.



Slika 13: Potek formulacije vzorca

Da smo lahko ekstrakt shranili v obliko, pripravljeno za uživanje, smo ga formulirali. To smo naredili tako, da smo v naš vzorec dodali stearinsko kislino, ki je posledično povzročila strditev zmesi in nastaneka kapsulirane oblike vzorca.



Slika 14: Kapsuliran in shranjen vzorec

Vzorec smo prenesli v kapsulo, pripravljeno za uživanje.

## 5 Rezultati

### 5.1 Postopek konvencionalne ekstrakcije

Maso polne bučke (z ekstraktom) smo odšteli od mase prazne bučke ter razliko vstavili v enačbo za izračun izkoristka ekstrakcije, dobljeno vrednost pomnožili s 100 in tako izračunali vrednost v odstotkih.

$$m_{ekstrakt} = m_{bucka+ekstrakt} - m_{bucka}$$

$$m_{ekstrakt} = 140,7303 \text{ g} - 127,1932 \text{ g}$$

$$m_{ekstrakt} = 13,5371 \text{ g}$$

Masa ekstrakta je znašala 13,5371 g.

$$\eta_{ekstrakcije} = \frac{m_{ekstrakt}}{m_{material}} \cdot 100$$

$$\eta_{ekstrakcije} = (13,5371 \text{ g} : 25,0000 \text{ g}) \cdot 100$$

$$\eta_{ekstrakcije} = 0,5415 \cdot 100 \rightarrow 54,25 \%$$

Izračunali smo, da izkoristek ekstrakcije znaša 54,15 odstotka.

### 5.2 Določanje antioksidativnega delovanja na radikale z metodo DPPH (1,1-difeni-2-pikrilhidrzila)

Računalniška analiza je vzorec in slepi vzorec analizirala. Spodaj so zapisani izračuni vrednosti antioksidativne aktivnosti ekstrakta.

**Izračun prve meritve:**

$$\% \text{ inhibicije} = \left( \frac{A_c^0 - A_s^{15}}{A_c^0} \right) \cdot 100$$

$$\% \text{ inhibicije} = ((0,4349 - 0,3844) : 0,4349) \cdot 100$$

$$\% \text{ inhibicije} = 0,1161 \cdot 100$$

$$\% \text{ inhibicije} = 11,61$$

Izračun prve meritve je pokazal, da znaša antioksidativna aktivnost vzorca 11,61 odstotka.

### Izračun druge meritve:

$$\% \text{ inhibicije} = \left( \frac{A_c^0 - A_s^{15}}{A_c^0} \right) \cdot 100$$

$$\% \text{ inhibicije} = ((0,4349 - 0,3795) : 0,4349) \cdot 100$$

$$\% \text{ inhibicije} = 0,1274 \cdot 100$$

$$\% \text{ inhibicije} = 12,74$$

Po izračunu druge meritve je vrednost antioksidantov v ekstraktu 12,74 odstotka.

Upoštevali smo meritev z višjo dobljeno vrednostjo antioksidativne aktivnosti, torej drugo.

Dejavniki, ki so vplivali na dobljeno vrednost antioksidativnega delovanja ekstrakta, so bili: motoda sušenja, izvor oziroma geografsko poreklo, ekstrakcija, uporabljeni topila in kemikalije ter njihova količina.

## 5.3 Formulacija ekstrakta v organogel

Gele lahko definiramo kot polrdno formulacijo z apolarnim (organogeli) ali s polarnim (hidrogeli) topilom in z notranjo tridimenzionalno mrežno strukturo.

Organogeli so torej tridimenzionalne strukture, sestavljene iz gelatorja in apolarnega topila. Organogeli lahko vsebujejo vodne molekule, ujete v samosestavljeni strukture gelatorja.

Organogelatorji imajo, kot smo ugotovili, ključno vlogo pri oblikovanju organogela. Glede na sposobnost tvorjenja vodikove vezi jih delimo na tiste, ki je ne tvorijo (npr. antracen), in tiste, ki vez tvorijo (npr. aminokisline). Med nekatere pogoste vrste organogelov uvrščamo: lecitin organoge, pluronik lecitin organoge (PLO), vrhunski lecitinske organoge (PrLO), limonen GP1/PG organoge, organoge na osnovi mikroemulzije (MBG), stabilizirane z želatino, sorbitanske organoge, pridobljene iz maščobnih kislin, in polietilenske organoge. [43]

V naši raziskovalni nalogi smo za organogelator izbrali stearinsko kislino, ki spada med maščobne kisline (naš organogel torej posledično uvrščamo med sorbitanske organoge). [44] Videli smo, da je bele do rumenkaste barve, ima nekoliko neprijeten vonj, je netopna v vodi, topna pa v olju in alkoholi. Nahaja se v živalskih derivatih in rastlinskih maščobah. Uporablja se v kozmetičnih izdelkih, uporablja se kot dišava, sufaktant in emulgator, kot osnova za izdelavo drugih maščobnih kislin, tudi kot sestavina v svečah, prehranskih dopolnilih itd. Je ena najpogostejših nasičenih maščobnih kislin v naši prehrani, kar je bil tudi eden izmed vzrokov za njeno izbiro. Pri formulaciji našega ekstrakta v organogel smo jo

uporabili tudi zato, ker zelo dobro deluje kot sredstvo za stabilizacijo emulzije in ima učinkovite lastnosti zgoščevanja, kar smo opazili tudi sami. Stearinska kislina se je v ekstraktu, postavljenem na magnetnem mešalu, ob višji temperaturi po nekaj minutah izvrstno raztopila. Ob hlajenju oziroma prenosu gela v kapsulo je bilo hitro opaziti prehod v trdnejše stanje zmesi ekstrakta in gelatorja, posledično je končna želena oblika nastala hitro.

## 6 Zaključek

Na svetu se vedno bolj vračamo k naravi in stremimo k vedno večji uporabi naravnih živil, saj se zavedamo njihove pomembnosti v prehrani. Ugotovili smo, da je cvetni prah super živilo (česar so se zavedali že v zgodovini), je v celoti naravnega izvora in ima mnogo hranljivih snovi, kot so vitamini, minerali, beljakovine, aminokisline, encimi, hormoni, maščobe in naravni antibiotiki. Vse skupaj služi za ohranjanje in izboljševanje našega zdravja ter za krepitev imunskega sistema. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da lahko pelod uporabljamo kot učinkovit naravni dodatek pri zdravljenju različnih bolezni. S tem ko je naraščalo povpraševanje po pelodu, so se začele intenzivneje razvijati različne tehnike in metode samega nabiranja, razširile so se možnosti njegove predelave in uporabe v naši vsakodnevni prehrani.

Poleg zanimanja za cvetni prah v zadnjih letih strmo narašča tudi zanimanje za izdelke na osnovi organogelov. Uporaba organogelov kot transportnega sredstva za dostavo zdravil je bila do sedaj precej omejena, saj so bili sestavljeni iz bionezdružljivih komponent. V zadnjem času se je to na srečo začelo spremenjati, vendar smo še le v začetni fazi pozitivnih premikov na tem področju. Po pregledu literature in opravljenem eksperimentalnem delu lahko potrdimo, da dobrega gela resnično ni lahko ustvariti (znanstveniki se lahko trudijo več let), saj moramo odlično poznati vse lastnosti uporabljenih snovi, jo na najoptimalnejši način predelati (da ohrani čim več naravnih pozitivnih učinkov) in jo formulirati v gel, tako da uporabimo primeren gelator in količino sestavin, da ne pride do uničenja hranilnih snovi oziroma samega gela. V raziskovalni nalogi smo glede na cilj predstavili produkt, to je formuliran ekstrakt peloda (kot organogel v kapsuli), ki bi lahko predstavljal potencial za novo zdravilo.

Uporaba organogelov je že sedaj pomemben način dostave zdravil in predvidevamo, da bo v prihodnosti njena razširjenost še naraščala na področjih parenteralne dostave (boljše aplikacije zdravila v telo mimo prebavil z injiciranjem, infundiranjem ali implantiranjem), oralnega uživanja organogelov (študije kažejo, da lahko z njimi vplivamo na nadzorovan sproščanje bioaktivnih snovi, s povečanjem koncentracije organogenelatorja v organogel pride do kasnejšega zmanjšanja hitrosti sproščanja ...), transdermalne dostave sistemov zaradi njihove sposobnosti izboljšanja hitrosti transporta bioaktivnih snovi (organogeli na osnovi lecitina so bili že dolgo preizkušeni kot matrika za transdermalno dostavo, vendar znanstveniki prihajajo v zadnjih časih do novih, prelomnih odkritij, tj. od zmanjšane rasti celic tumorja pri golih miših do skoraj popolne perkutane absorbcije na eksperimentalnih človeških modelih).

Termoreverzibilna lastnost organogelov je ustvarila veliko zanimanje za potencialno uporabo organogelov kot sistema za dostavo zdravil. Termodinamično stabilno naravo

organogelov pripisujejo spontani tvorbi vlaknaste strukture, zaradi katere se organogeli nahajajo v nizkem energijskem stanju.

Naštevamo pomembne fizikalno-kemijske lastnosti organogelov:

- visokoelastičnost (pri nižjih strižnih stopnjah se obnašajo kot trdna snov, pri višjih (z višanjem temperature) pa začnejo organogeli teči, saj začnejo točke fizičnega medsebojnega delovanja med strukturami vlaken slabeti, dokler ne pride do motenja interakcij med njimi),
- nedvolomnost (preprečevanje prehoda polarizirane svetlobe skozi matriko),
- termoreverzibilnost (ob segrevanju nad kritično temperaturo začnejo organogeli teči; ko se hladijo, nad njimi prevladajo organogelatorji in organogeli se vrnejo nazaj v stabilnejšo konfiguracijo),
- termostabilnost (sposobnost gelatorjev, da se pod ustreznimi pogoji samosestavijo v organogelete; prav zaradi te lastnosti so bili predlagani kot dostavno sredstvo za bioaktivna sredstva, pri katerih je zaželen daljši rok uporabnosti),
- optična jasnost (glede na sestavo so lahko prozorni (npr. lecitin organogeli) ali nepreprozorni (npr. sorbitan monostearati)),
- učinki kiralnosti (dober gelator iz trdnih vlaken ima kiralno središče, ki zagotavlja termodinamično in kinetično stabilnost sistemu organogela, medtem ko na gelatorje s tekočimi vlakni kiralnost nima vpliva),
- biokompatibilnost (uporaba različnih biokompatibilnih sestavin odpira nova vrata v uporabi organogelov v biomedicini za razliko od njihove prvotne izdelave iz različnih biokompatibilnih organogelov, za kar so bili nezdružljivi). [43]

## 6.1 Ključne ugotovitve na podlagi pregledane literature

V pregledani literaturi in že opravljenih raziskavah so preverjali najoptimalnejši postopek ekstrakcije cvetnega prahu, ki vsebuje največ antioksidativnih sestavin. Poglejmo si uporabljenе postopke in metode, med katerimi je potekala primerjava in na podlagi katerih smo se posledično odločili za uporabljeno vrsto ekstrakcije in metodo preverjanja antioksidativnosti.

Uporabljena sta bila dva načina priprave vzorca (brez mletja peloda pred začetkom ekstrakcije in z mletjem), različni, največkrat uporabljeni postopki ekstrahiranja (mešanje oz. topla maceracija, maceracija, refluks in sonifikacija) in topil (metanol, 70-odstotni vodni etanol, etanol in voda).

Opisujemo uporabljenе postopke ekstrahiranja na podlagi pregledane literature.

- Topla maceracija: ekstrakcijo so izvedli v dveh urah v 7 mL topila z uporabo magnetnega mešala z vročo ploščo, ki je delovalo pri hitrosti 1500 rpm, in to pri temperaturi, nastavljeni

na 40 °C. Po dveh urah so topilo odlili in ga nadomestili s svežim topilom ter postopek ekstrakcije ponovili še dvakrat za vsak vzorec.

- Maceracija: vzorec čebeljega cvetnega prahu so tri dni macerirali v 7 mL ekstrakcijskega topila pri sobni temperaturi (25 °C) pri hitrosti 160 vrt./min in topilo menjali vsakih 24 ur.
- Refluks: za to metodo so uporabili 21 mL topila in temperaturo ekstrakcije, določeno z vreliščem zadevnega topila. Ekstrakcijo so izvedli enkrat v 2 urah za vsak vzorec.
- Sonikacija: ekstrakcijo so izvedli z 21 mL topila s sondo sonikatorja, ki deluje pri 130 W in 20 kHz. Amplitudo so nastavili na 100 odstotkov in postopek ekstrakcije izvajali 30 minut v ledeni kopeli (samo enkrat).

Po ekstrakciji so topilo filtrirali. Dobljene raztopine so shranili pri –85 °C do nadaljnje analize. Vsak postopek ekstrakcije je bil izведен v treh izvodih za vsak vzorec cvetnega prahu. [1]

Na podlagi pogostosti uporabe so izbrali (kot neodvisne spremenljivke) dve ravni za pulverizacijo (surovo in pulverizirano), štiri ravni za ekstrakcijsko topilo (70-odstotni etanol, etanol, voda in metanol) in štiri vrste za postopek ekstrakcije (topla maceracija, maceracija, refluks in ultrazvočna obdelava). Antioksidativno aktivnost so preverjali z metodami TPC, DPPH in FRAP.

Dokazano je bilo, da imata vrsta topila in postopek ekstrakcije pomemben vpliv na antioksidativno aktivnost TPC, DPPH in FRAP cvetnega prahu. Prav tako je bilo ugotovljeno, da ima od vseh treh neodvisnih spremenljivk, izbira topila prevladujoč učinek na vrednost antioksidantov na vseh izbranih testih.

Če ugotovitve za metodo DPPH pogledamo natančneje, vidimo, da je topilo (E70 : 30) najboljša izbira za najvišji izkoristek ekstrakcije. Med izbranimi postopki ekstrahiranja pa je najoptimalnejša topla maceracija s katero koli izmed štirih vrst topila. [2]

Prav zaradi te potrjene ugotovitve smo se odločili za ta način ekstrakcije našega vzorca.

## 6.2 Ovrednotenje rezultatov in metod

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo na podlagi pregledane literature za prvo hipotezo postavili, da bo izkoristek ekstrakcije s toplo maceracijo in uporabo (E70 : 30) topila znašal manj kot 50 odstotkov. Hipotezo lahko ovržemo, saj je dobljena vrednost izkoristka uporabljene konvencionalne ekstrakcije znašala 54,15 odstotka, kar presega postavljenou hipotezo.

Drugo hipotezo, prav tako postavljeno na podlagi predhodno pregledane literature, ki pravi, da bo antioksidativna vrednost ekstrakta znašala več kot 8 odstotkov, potrjujemo, saj smo izračunali 12,74-odstotno delovanje antioksidantov v našem ekstraktu. Tudi s to dobljeno vrednostnjo smo zelo zadovoljni.

Tretjo hipotezo, v kateri predvidevamo, da bomo morali pri formulaciji ekstrakta v organogel poleg stearinske kislino kot gelatorja uporabiti tudi olje, lahko prav tako ovržemo, saj je za dobro formulacijo zadostovala sama stearinska kislina.

### 6.3 Možne izboljšave eksperimenta

Ekstrakcija je potekala brez težav in zapletov, zelo zadovoljiva pa je tudi izračunana vrednost antioksidantov v ekstraktu.

Možna izboljšava bi lahko bila, da bi poleg konvencionalne ekstrakcije pridobili ekstrakt še sami s kako drugo metodo in nato primerjali sam potek in izkoristek ekstrakcij. Tudi antioksidativno aktivnost bi lahko prevereli še kako drugače, ponovno primerjali dobljene vrednosti in definirati vzroke za razlike.

Pri sami formulaciji ekstrakta smo lahko zelo zadovoljni, saj kot topila nismo bili primorani uporabiti še olja, ki bi ga morali v primeru, če se stearinska kislina ne bi dobro zmešala z ekstraktom (kar bi laže dosegli z uporabo olja), a hkrati v tem primeru ne bi dobili popolnoma naravnega kapsuliranega ekstrakta cvetnega prahu.

Izredno zanimiva bi bila nadaljnja analiza kapsuliranega ekstrakta, in sicer na primeru sproščanja bioaktivnih komponent v dostavnem sistemu.

## 7 Literatura

- [1] Čebele prinašalke življenja, Triglavskazakladnica. (2018).  
<https://www.triglavskazakladnica.si/asset/BWstSQuqjt8t8dvck>.
- [2] I. L. Lawag, O. Yoo, L. Y. Lim, K. Hammer, C. Locher, Optimisation of Bee Pollen Extraction to Maximise Extractable Antioxidant Constituents, *Antioxidants*. 10 (2021) 1113.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10071113>.
- [3] G. Torkar, Cvetni prah, pelod, pelodna zrna, naravoslovna solnica. Letnik 23, številka 1, jesen 2018. Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta.
- [4] Čebelarska zveza Slovenije, Poročilo aplikativne raziskave: Karakterizacija čebeljih pridelkov ter vpliv postopkov obdelave in shranjevanja cvetnega prahu na njegovo kemijsko in mikrobiološko sestavo. (2019).
- [5] S. Plut, Cvetni prah, Čebelarska zveza Slovenije. <https://www.czs.si/content/C22>.
- [6] S. A. M. Khalifa, M. H. Elashal, N. Yosri, M. Du, S. G. Musharraf, L. Nahar, S. D. Sarker, Z. Guo, W. Cao, X. Zou, A. A. A. El-Wahed, J. Xiao, H. A. Omar, M. E. F. Hegazy, H. R. El-Seedi, Bee Pollen: Current Status and Therapeutic Potential, *National Library of Medicine. Nutrients* (2021) 13(6) 1867. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8230257/>.
- [7] M. Angelova, Antioksidativni potencial cvetnega prahu osmukanca. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. (2018).
- [8] Cvetni prah, Alpihiska. (2023). <http://www.apihiska.com/index.php/about/propolis-2>.
- [9] M. Nason, 8 bee pollen benefits, Lucky vitamin. (2019).  
<https://www.luckyvitamin.com/blog/food-supplements/supplements/8-bee-pollen-benefits/>.
- [10] T. Zakrajšek, Vpliv eksogenih antioksidantov na endogeni antioksidativni obrambni sistem pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. (2014).
- [11] Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Blanco, I., Hoffmann, T., Martin, H., Mayer, B., Noack, P., Ruck, C., Schmidt, M., Schulke, I., Sell, S., Ernst, H., Haremza, S., Seybold, G., Sies, H., Stahl, W., Walsh, R. (2000). "Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of Bcarotene in antioxidant functions." *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81:559-568. Kaj so antioksidanti?, sensilab. (2023). <https://www.sensilab.si/news/kaj-so-antioksidanti>.
- [12] Antioxidants: In Depth, National Center for Complementary and Integrative Health. (2013).  
<https://www.nccih.nih.gov/health/antioxidants-in-depth>.
- [13] K. Konečnik, Sinteza 2-aminotiofenov iz triacetonamina in vrednotenje njihovih antioksidativnih lastnosti. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. (2016).
- [14] L. Slavec, Sinteza izbranih kinazolinonov ter vrednotenje njihove antioksidativne kapacitete in sposobnosti kelacije kovinskih ionov. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. (2018).
- [15] Paradoks metabolizma (3. del): Oksidativni stres in antioksidanti, Prehranska akademija. (2020).  
<https://prehranska-akademija.si/index.php/prehranska-akademija-blog/64-paradoks-metabolizma-3-del-oksidativni-stres-in-antioksidanti>.
- [16] D. B. Hermund, Antioxidant Properties of Seaweed-Derived Substances, *Bioactive Seaweeds for Food Applications*, Science Direct. (2018).  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128133125000108>.
- [17] I. H. Menih, Primerjava antioksidativnega delovanja prehranskih dopolnil, čajev in svežih rastlin ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*) in ingverja (*Zingiber officinalis*). II. gimnazija Maribor. (2014).
- [18] Povišajmo nivo glutationa, najmočnejšega naravnega antioksidanta, Avita. (2020).  
<https://www.avita.si/povisajmo-nivo-glutationa-najmocnjsega-naravnega-antioksidanta/>.
- [19] Definicija hrane, Internetska nutricionistička enciklopedija. (2015).  
<https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/minerali/selen-se/funkcije/>.

- [20] Koencim Q10 – čudežna substanca?, ABCzdravja. (2008).  
<https://www.abczdravja.si/hrana/koencim-q10-cudezna-substanca/>.
- [21] E. Žontar, Kaj so antioksidanti in kje jih najdemo?, Super hrana. (2018). <https://super-hrana.si/kaj-so-antioksidanti-in-kje-jih-najdemo/>.
- [22] Vitamin C prehranski viri, Prehrana. si. (2021). <https://www.prehrana.si/sestavine-zivil/vitaminini/vitamin-c>.
- [23] Vitamin E prehranski viri, Prehrana. si. (2021). <https://www.prehrana.si/sestavine-zivil/vitaminini/vitamin-e>.
- [24] Kaj so karotenoidi? FutuNatura. (2023). <https://www.futunatura.si/kaj-so-karotenoidi>.
- [25] Zanimivosti, Kmetijski inštitut Slovenije. (2023). <https://www.kis.si/Zanimivosti/>.
- [26] V. Abram, M. Simčič, Fenolne spojine kot antioksidanti. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. (1997).
- [27] K. Svetek, Ekstrakcija Eteričnih olj iz ingverja (*Zingiber officinale*). (2019). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- [28] H. David, Biološka aktivnost konvencionalnih ekstraktov iz paradižnika (*Solanum lycopersicum*). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. (2019).
- [29] Učilnica 1314, Praktični pristopi 6. Univerza v Ljubljani.
- [30] J. M. Prado, R. Vardanega, I. C. N. Debien, M. Angela, A. Meireles, L. N. Gerschenson, H. B. Sowbhagya, S. Chemat, Conventional extraction, Food Waste Recovery, Science Direct. (2021). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128205631000159>.
- [31] L. Josey, Soxhlet Extractor, ChemBAM. (2023). <https://chembam.com/definitions/soxhlet-extractor/>.
- [32] D. Aryal, Soxhlet Extraction: Principle, Extraction procedure, and Apparatus, Organic Chemistry Notes. (2022). <https://chemistnotes.com/organic/soxhlet-extraction-principle-extraction-procedure-and-apparatus/>.
- [33] Moj farmacevt, Izvlečki, Moj farmacevt zdravstveni portal. (2021). <https://www.mojfarmacevt.si/izvlecki/>
- [34] T. Makoter, Ekstrakcija biološko aktivnih komponent iz industrijske konoplje. (2019). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- [35] S. Farooq, S. A. Mir, M. A. Shah, A. Manickavasagan, Extraction techniques, Plant Extracts: Application in the Food Industry, Science Direct. (2022). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128224755000053>.
- [36] Zelena ekstrakcija, ŠKRLJ. (2023). <https://sk-skrlj.com/si/zelena-ekstrakcija>.
- [37] Delovni princip in prednosti ultrazvočne ekstrakcije tehnologije, RPS sonic. (2021). <https://si.sono-liquid.com/news/the-working-principle-and-advantages-of-ultras-54083640.html>.
- [38] Ultrazvočni ekstrakcija in njeno delovno načelo, hiielscher Ultrasound Tehnology. (2023). <https://www.hielscher.com/sl/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm>.
- [39] Superkritična in subkritična ekstrakcija, ŠKRLJ. (2023). <https://sk-skrlj.com/si/superkriticna-in-subkriticna-ekstrakcija>.
- [40] Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction, natex. (2023). <https://www.natex.at/co2-technology/supercritical-co2-extraction/>.
- [41] Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH° assay, Chimactiv. (2023). <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>.
- [42] T. Žitek, Antioksidativne lastnosti ekstraktov nekaterih rastlinskih materialov. (2016). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- [43] S. Sahoo, N. Kumar, C. Bhattacharya, S. S. Sagiri, K. Jain, K. Pal, S. S. Ray in B. Nayak. Organogels: Properties and Applications in Drug Delivery. Designed Monomers and Polymers. (2012). <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1163/138577211X555721>.
- [44] Stearinška kislina (Stearic Acid). FuturaNatura. (2023). <https://www.futunatura.si/stearinska-kislina>.